

Characterization of recombinant wild-type and mutant renins and prorenins

著者	Yamauchi Takeshi
内容記述	Thesis (Ph.D. in Agriculture)--University of Tsukuba, (B), no. 939, 1994.1.31
発行年	1994
URL	http://hdl.handle.net/2241/3869

氏 名(本 籍)	やま うち たけ し 山 内 健 司 (大 阪 府)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 939 号
学位授与年月日	平成 6 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT WILD-TYPE AND MUTANT RENINS AND PRORENINS (天然型ならびに改変型組換えレニンならびにプロレニンの性状分析に関する研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副 査	筑波大学教授 理学博士 新 井 勇 治
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌

論 文 の 要 旨

血圧調節に関与する酵素レニンは、活性中心に 2 個のアスパラギン酸残基 (Asp) を持つ酸性プロテアーゼに属する。この酵素は、(1)中性条件下では不活性な前駆体 (プロレニン) として生合成される。プロレニンは酸によって可逆的に活性化される、(2)他の酸性プロテアーゼとは異なり、中性付近に至適 pH を持つ、(3)基質特異性が非常に厳密にである、等の特徴を持っている。

レニンは生体から大量に単離するのが困難な酵素の一つであり、そのため従来よりレニンの薬理作用に関する知見が得られても、それを酵素レベルあるいは分子レベルで理解する事は困難であった。しかしながら、近年発達した遺伝子工学の手法で調製した組換えレニンを用いる事によって、酵素・分子レベルの研究が大きく前進した。特に動物細胞発現系で産生した組換えレニンは、付加する糖鎖構造や比活性など生体由来のレニンと類似した性状を示すと考えられ、レニンの酵素・分子レベルの研究には欠かせないものとなりつつある。また組換えレニンでは、遺伝子レベルで容易にアミノ酸残基を置換でき、天然にない改変レニンを作る事が可能である。この蛋白質工学の技術は、蛋白質の構造と機能の相関を調べる上で最も協力的な武器の一つであり、レニンについても既に幾つかの成果が得られつつある。

そこで、本研究では天然型ならびにアミノ酸残基を置換した改変型レニンを動物細胞で発現させ、その性状分析を行うことによって、レニンの示すユニークな性質を酵素レベルや分子レベルで理解するための知見を得ることを試みた。

(1) 組換えラットレニンの動物細胞における発現・精製・性状分析

組換えラットレニンを得る事を目的に、ラットレニン cDNA を動物細胞用の発現ベクターに組み込み、2種類の動物細胞（COS 細胞、CHO 細胞）に導入した。いずれの細胞でも、トリプシン処理した培養上清中にレニン活性が検出された事から、レニン前駆体（プロレニン）が分泌されていると考えられた。COS 細胞で発現したプロレニンをトリプシン処理でレニンに変換し、その基質特異性を3種類の基質で比較すると、予想通りラット基質に対して最も高い活性を示した。

次にラットレニン cDNA を導入した CHO 細胞の培養上清から、組換えレニンを精製した。培養上清をトリプシン処理の後、硫酸沈澱を行い活性型レニンを回収した。得られた活性画分を、ペプスタチンをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーと、CM-ートヨパールを用いた HPLC で精製した。5 l の培養上清より出発して、0.74mg の精製組換えレニンが得られ、精製倍率は240倍であった。また精製品は SDS-PAGE で単一のバンドを示した。

得られた組換えレニンについて、ラット腎臓より抽出したレニンと性状を比較した。組換えレニンは分子量、等電点、至適 pH、Km、比活性、糖鎖の存在、などの点でラット腎レニンとほぼ同じ性質を示した。組換えレニンのアミノ末端の配列は、cDNA より予想される配列と一致していたが、ラット腎レニンに報告されているアミノ末端に比べて3アミノ酸残基が余分に結合していた。以上の様に、本研究で得られた組換えレニンは、ラット腎レニンと非常に似た性質を示し、レニンの薬理学的・生化学的・酵素学的研究に用いる事ができると考えられた。

(2) ヒトレニンの至適 pH 決定に関与するアミノ酸残基の解析

レニンは他の酸性プロテアーゼと異なり、中性付近に至適 pH を持つ。ヒトレニンの立体構造から、その活性中心近傍にはアラニン残基（Ala 317）が存在すると予想される。この残基はマウスやラットのレニンでは保存されているが、他の酸性プロテアーゼでは Asp に置き換わっている。従ってこの残基の違いが活性中心の Asp 残基の pKa に影響を与え、その結果、至適 pH の違いが生じている可能性が高い。この仮説を検証するために、ヒトレニン cDNA の塩基配列の一部を置換し、それを COS 細胞に導入して、Ala 317 を Asp 残基に置き換えた改変型プロレニンを得た。これをトリプシンで改変型レニンへと変換し、その性状を同じく COS 細胞で発現した天然型レニンと比較した。

COS 細胞で発現した天然型ヒトレニンは、ヒト腎レニンと似た性質を示し、ブタアンジオテンシノーゲンを基質とした場合の至適 pH は7.8であった。一方 Ala 317 を Asp 残基に置換した改変型レニンの至適 pH は、天然型レニンよりも酸性側にシフトしており、7.3であった。ヒトのアンジオテンシノーゲンを基質に用いた場合も、Ala 317 を Asp 残基の置換する事により、至適 pH が酸性側へシフトした。以上の結果より、ヒトレニンの活性中心近傍にある Ala 317 が、その至適 pH を中性付近に保つのに重要な役割を担っている事が明らかとなった。この残基はマウスやラットのレニンでも保存されており、これらのレニンでも至適 pH を中性付近に保つ働きをしていると予想される。

(3) ヒトプロレニンを不活性に保つアミノ酸残基の解析

レニンや他の酸性プロテアーゼの前駆体は、中性条件下では不活性であるが、酸性条件下で活性化される性質を持っている。レニンの前駆体であるプロレニンと、その他の酸性プロテアーゼの前駆体

には、プロペプチド部分にかなり高いホモロジーが存在する。特にヒトプロレニンの10, 15, 20番目と43番目のアルギニン残基(Arg)は、大部分の酸性プロテアーゼで塩基性残基として保存されている。既に立体構造が解析されているブタペプシノーゲンとのホモロジーから、ヒトプロレニンのこれらの塩基性残基は酵素本体の酸性アミノ酸残基と静電的相互作用で結合し、プロペプチドを活性中心を覆う位置に固定する事によって、プロレニンを不活性に保っている可能性が考えられる。この仮説を検証するために、これらの残基を電荷を持たないグルタミン残基(Gln)に遺伝子レベルで置換し、動物細胞で発現させて得られた改変型プロレニンの性状を調べた。

その結果、本来中性条件下で不活性なプロレニンが、10, 15, 20番目の Arg 残基を Gln 残基に置換する事によって中性条件下でも部分的な活性を示す様になり、その一部が活性型プロレニンに変換された事がわかった。中性条件下で活性を示す活性型プロレニンの割合は、これらの残基を同時に複数個 Gln 残基に置換すると相加的に増加し、すべてを置換すると81%が活性型プロレニンとなった。一方、これらの残基をリジン残基(Lys)に置換した場合には、天然型プロレニンと同様に中性条件下で不活性であった。また、他の塩基性残基(9, 14番目の Lys 残基, 32, 43番目の Arg 残基)を Gln 残基に置換しても、活性型プロレニンへの変換はおこななかった。

以上の結果から、ヒトプロレニンプロペプチドの10, 15, 20番目の Arg 残基の持つ正の電荷が、酵素本体の酸性アミノ酸残基の負の電荷と静電的相互作用で結合し、プロレニンを中性条件下で不活性に保つ働きをしている事が示唆された。これらの塩基性残基は他の酸性プロテアーゼ前駆体のプロペプチドでひろく保存されており、それらにおいてもプロレニンと同様な役割を担っている可能性が示唆される。

審 査 の 要 旨

レニンは、血圧や体液量の調節、電解質バランスの維持などに重要な酵素であるが、従来は生体中の含量が低いため単離が困難であった。しかしながら、遺伝子組換え技術の導入により、純粋な組換え酵素が大量に得られる様になった。本研究では、動物細胞で発現したラットレニンを精製し、得られた組換えレニンの性状が、生体由来のものとよく似ていることを報告している。従って組換えラットレニンは、生体由来のレニンに代わって、レニンの酵素学的な研究や薬理学的あるいは生理学的な研究に大いに貢献できると考えられる。また本研究では、遺伝子組換え技術を用いてレニンならびにその前駆体(プロレニン)のアミノ酸残基を置換した改変体を作製し、その性状を天然型の酵素と比較して、この酵素の構造と機能に相関を調べている。なかでも、レニンが他の酸性プロテアーゼと異なり中性付近に至適 pH をもつ原因として、特定のアミノ酸残基の相異を指摘した研究は、レニンのユニークな性質をその構造と関連づけた最初の研究として高く評価できる。また、酸によってプロレニンが可逆的に活性化される現象を蛋白質工学的な手法で解析した研究では、site-directed mutagenesis を駆使して多くの改変型プロレニンを作製している。それらの性状を調べた結果、プロペプチド中の特定の塩基性アミノ酸残基がプロレニンを中性条件下で不活性に保つ上で重要である事を指摘し

ている。これらの塩基性アミノ酸残基は、他の酸性プロテアーゼ前駆体でも保存されており、これら前駆体を不活性に保つ共通の機作がある事を示唆している点でも意義深い。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。